



14

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 41 07 152 A 1**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**A 61 K 9/127**  
A 61 K 37/26

21 Aktenzeichen: P 41 07 152.2  
22 Anmeldetag: 6. 3. 91  
43 Offenlegungstag: 10. 9. 92

09 890 371  
10/29/03

DE 41 07 152 A 1

71 Anmelder:  
Cevc, Gregor, Prof. Dr., 8011 Heimstetten, DE

72 Erfinder:  
gleich Anmelder

74 Vertreter:  
Eisenführ, G., Dipl.-Ing.; Speiser, D., Dipl.-Ing., 2800  
Bremen; Strasse, J., Dipl.-Ing., 8000 München;  
Rabus, W., Dr.-Ing., 2800 Bremen; Brügge, J.,  
Dipl.-Ing.; Maiwald, W., Dipl.-Chem.Dr., 8000  
München; Klinghardt, J., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte,  
2800 Bremen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Präparate zur nichtinvasiven Verabreichung von Antidiabetica

57 Präparat zur nichtinvasiven Verabreichung von antidiabetischen Wirkstoffen, besonders von Insulin, in Form liposomenartiger, den Wirkstoff enthaltender Tröpfchen von in einer membranartigen Hülle aus amphiphiler Substanz eingeschlossener, hydrophiler Flüssigkeit. Das Präparat weist einen Gehalt einer randaktiven Substanz auf.

DE 41 07 152 A 1

14

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Präparate zur nichtinvasiven Verabreichung von antidiabetischen Wirkstoffen, besonders von Insulin, in Form von liposomenartigen, den Wirkstoff enthaltenden Tröpfchen von in einer membranartigen Hülle aus amphiphiler Substanz eingeschlossener hydrophiler Flüssigkeit, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Bestrebungen, antidiabetische Stoffe in den Körper zu bringen, ohne die übliche Injektionsnadel zu verwenden, bestehen schon lange (siehe z. B. die Übersicht von Lassmann-Vague, (Diabete. Metab. 14, 728, 1989). So wurde z. B. vorgeschlagen, implantierbare Vorratsbehälter (Wang, P.Y, Biomaterials 10, 197, 1989) oder Pumpen (Walter, H et al., Klin. Wochenschr. 67, 583, 1989) zu benutzen, eine Insulinlösung transnasal (Mishima et al., J. Pharmacobio.-Dynam. 12, 31, 1989), perocular (Chiou et al., J. Ocul. Pharmacol. 5, 81, 1989), peroral in einer Liposomensuspension (Rowland + Woodley, Biosc. Rep. 1, 345, 1981) oder transrectal zu applizieren; wenn die Insulinmoleküle durch die Haut eingebracht werden sollen, wurde die Agenslösung z. B. transcutan mittels Jetinjektion (Siddiqui + Chien, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst. 3, 195, 1987), mit Hilfe von kleinen Injektoren (Fisken, Lancet 1, 787, 1989), von elektrischen Feldern (Burnette + Ongpipattanakul, J. Pharm. Sci. 76, 765, 1987; Meyer, B.R et al., Amer. J. Med. Sci. 297, 321, 1989) bzw. von chemischen Additiva permeationsmäßig unterstützt.

Alle diese Verfahren haben aber kaum eine Erleichterung für den Diabeteskranken gebracht — vielleicht mit der Ausnahme der Jetinjektion, die jedoch nur eine verfeinerte, technisch sehr aufwendige Form der Injektion ist und daher wenig verbreitet. Der Alltag eines jeden insulinabhängigen Patienten beinhaltet weiterhin das tägliche Injizieren einer Insulinlösung unter die Haut bzw. in das Muskelgewebe (De Meijer, P. et al., Neth. J. Med. 34, 210, 1989).

Lipide wurden bisher als Excipienten für die verzögerte Freisetzung von Insulinimplantaten diskutiert (Wang, P.Y Int. J. Pharm. 54, 223, 1989) oder, in Form von Liposomen, als Vehikel für die perorale Applikation vorgeschlagen (Patel, 1970), ohne daß jedoch die Ergebnisse reproduzierbar wären (Biochem. Int. 16, 983, 1988). Weitere Arbeiten auf dem Gebiet der insulinhaltigen Liposomen befaßten sich mit methodologischen, nicht therapeutischen Fragen (Wiessner, J. H. und Hwang, K. J. Biochim. Biophys. Acta 689, 490, 1982; Sarrach, D. Stud. Biophys. 100, 95, 1984; Sarrach, D. und Lachmann, U. Pharmazie 40, 642, 1985; Weingarten, C. et al. Int. J. Pharm. 26, 251, 1985; Sammins, M.C. et al., J. Pharm. Sci. 75, 838, 1986; Cervato, G. et al., Chem. Phys. Lipids 43, 135, 1987).

Es ist daher eine Aufgabe der Erfindung, Präparate zur nichtinvasiven Verabreichung von antidiabetischen Wirkstoffen, besonders von Insulin, zu schaffen, die eine verbesserte, therapeutisch ausreichende und reproduzierbare Wirkstoffapplikation ermöglichen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung solcher Präparate bereitzustellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen die Merkmale der unabhängigen Patentansprüche.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen definiert.

Überraschend wurde gefunden, daß durch den Einsatz von neuartigen Wirkstoffträgern, hier als Transfersomen bezeichnet, Antidiabetesmittel ohne Spritzen oder Begleitmaßnahmen durch die Haut in das Blut eingeschleust werden können. So erreichen z. B. regelmäßig mehr als 50%, häufig mehr als 90%, der perkutan applizierten Insulinmoleküle ihren Bestimmungsort im Körper, wenn sie mittels Transfersomen angebracht wurden. Insulinhaltige Transfersomen, die auf die Haut aufgetragen werden, können folglich erfolgreich das Spritzen von Insulinlösungen ersetzen.

Durch diese Erfindung wurde somit ein Weg gefunden für die einfache, nichtinvasive und vollkommen schmerzlose Therapie von Typ II Diabetes: Transfersomen können alleine oder in Kombination mit beliebigen Dosiergeräten zur problemlosen akuten und/oder chronischen Diabetesbehandlung eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Transfersomen sind bekannten Liposomen ähnlich. Wie diese umfassen sie (wenigstens) eine amphiphile Substanz, insbesondere ein Lipid, die mit Wasser und anderen polaren hydrophilen Stoffen Vesikelstrukturen ausbilden kann. In diesen ist ein mikroskopisches Tröpfchen hydrophiler Flüssigkeit von wenigstens einer Hülle aus amphiphiler Substanz umschlossen, wobei der Durchmesser der Transfersomen insgesamt von der Größenordnung von weniger als ein Zehntel um bis zu einigen  $\mu\text{m}$  ist, jedoch kleineren Trägern häufig Vorrang gegeben wird. Überlicherweise wird die sehr viel größere Permeationsfähigkeit von Transfersomen (im Vergleich mit bekannten Liposomen) durch randaktive Substanzen zur erreicht. Näheres ist in der gleichzeitig eingereichten deutschen Patentanmeldung des gleichen Anmelders mit dem Titel "Präparat zur Wirkstoffapplikation in Kleinsttröpfchenform" beschrieben, deren Inhalt hiermit ausdrücklich in den Offenbarungsgehalt dieser Anmeldung einbezogen wird.

Kritisch für die Permeationseigenschaften erfindungsgemäßer Transfersomen ist deren Elastizität, die ohne signifikante Beeinträchtigung der Gesamtstabilität wesentlich größer ist als bei bekannten, ähnlichen Liposomen.

Diese größere Elastizität (und damit Permeationsfähigkeit) wird beispielsweise und bevorzugt dadurch erreicht, daß den Transfersomen ein Gehalt an randaktiver Substanz gegeben wird, der eine optimale Annäherung an die Solubilisierungsgrenze bewirkt, d. h. an einen Gehalt an randaktiver Substanz, der die Tröpfchen destabilisieren würde.

Vorteilhaft ist mindestens eine Trägersubstanz ein physiologisch verträgliches polares oder nichtpolares Lipid oder eine andere pharmakologisch unbedenkliche amphiphile Substanz; die geeigneten Moleküle sind dadurch gekennzeichnet, daß sie stabile wirkstofftragende Aggregate bilden. Die bevorzugte Aggregatform sind Lipidvesikel, die bevorzugte Membranstruktur ist eine Doppelschicht.

Vorteilhaft wird weiter vorgesehen, daß mindestens eine solche Substanz ein Lipid oder Lipoid aus biologischer Quelle oder ein entsprechendes synthetisches Lipid ist, bzw. eine Abwandlung solcher Lipide, zum Beispiel ein Glycerid, Glycerophospholipid, Sphingolipid, Isoprenoidlipid, Steroid, Sterin oder Sterol, ein schwefel- oder

kohlehydrathaltiges Lipid, oder aber ein beliebiges anderes Lipid, das stabile Doppelschichten bildet, z. B. eine halbprotonierte fluide Fettsäure. So werden Lipide aus Ei, Sojabohne, Kokosnuß, Oliven, Saflor, Sonnenblumen, Leinsamen, Walfett, Nachtkerze oder Primel verwendet, mit natürlich belassenen oder, teilweise oder voll hydrogenierten (gehärteten), bzw. ausgetauschten Ketten. Besonders häufig finden die entsprechenden Phosphatidylcholine Anwendung; aber auch Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerole, Phosphatidyl-  
 5  
 inositole, Phosphatidsäuren und Phosphatidylserine, sowie Sphingomyeline oder Sphingophospholipide, Glykosphingolipide (z. B. Cerebroside, Ceramidpolyhexoside, Sulfatide, Sphingoplasmalogene), Ganglioside oder andere Glycolipide sind für die Anwendung im Sinne dieser Erfindung gut geeignet. Von synthetischen Lipiden werden vorzugsweise die entsprechenden Dioleoyl-, Dilinoleyl-, Dilinolenoyl-, Diaracidonyl-, Dimyristoyl-, seltener Dipalmitoyl-, Distearoyl-, phospholipide oder die entsprechenden Sphingosinderivate, Glykoli-  
 10  
 pide oder sonstige Diacyl- bzw. Dialkyl-Lipide verwendet; auch beliebige Kombinationen der erwähnten Substanzen sind geeignet.

Vorteilhaft ist die randaktive Substanz ein nichtionisches, ein zwitterionisches, ein anionisches oder ein kationisches Tensid. Sie kann einen Alkoholrest enthalten. Gerne werden langkettige Fettsäuren oder Fettalkohole, Alkyl-trimethylammonium-Salze, Alkylsulfat-Salze, Cholat-,  
 15  
 Deoxycholol-, Glycodeoxycholol-, Taurodeoxycholol-Salze, Dodecyl-dimethylaminoxid, Decanoyl- oder Dodecanoyl-N-methylglucamid (MEGA 10, MEGA 12), N-Dodecyl-N,N-dimethylglycin, 3-(Hexadecyldimethylammonio)-propansulfonat, N-Hexadecyl-sulfobetain, Nonaethylenglykol-octylphenylether, Nonaethylen-dodecylether, Octaethylenglykol-isotridecyl-ether, Octaethylen-dodecylether, Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20), Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monooleat (Tween 80), Polyhydroxyethylen-cetylstearylether (Cetomacrogro,  
 20  
 Cremophor O, Eumulgin, C 1000) Polyhydroxyethylen-4-laurylether (Brij 30), Polyhydroxyethylen-8-stearat (Myrj 45, Cremophor AP), Polyhydroxyethylen-23-laurylether (Brij 35), Polyhydroxyethylen-40-stearat (Myrj 52), Polyhydroxyethylen-100-stearat (Myrj 59), polyethoxyliertes Rizinußöl 40 (Cremophor EL),  
 25  
 polyethoxyliertes hydriertes Rizinußöl, Sorbitan-monolaurat (Arlace 20, Span 20), besonders bevorzugt Decanoyl- oder Dodecanoyl-N-methylglycamid, Lauryl- oder Oleoylsulfat-Salze, Natriumdeoxycholol, Natriumglycodeoxycholol, Natriumoleat, Natriumelaidat, Natriumlinoleat, Natriumlaurat, Nonaethylen-dodecylether, Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monooleat (Tween 80), Polyhydroxyethylen-23-Laurylether (Brij 35), Polyhydroxyethylen-40-Stearat (Myrj 52),  
 30  
 Sorbitan-Monolaurat (Arlace 20, Span 20), usw. verwendet.

Zu den geeigneten Tensiden dieser Substanzklassen gehören:  
 n-Tetradecyl(= Myristoyl)-glycero-phosphatidsäure, n-Hexadecyl(= Palmityl)-glycero-phosphatidsäure,  
 n-Octadecyl(= Stearyl)-glycero-phosphatidsäure, n-Hexadecylen(= Palmitoleil)-glycero-phosphatidsäure,  
 35  
 n-Octadecylen(= Oleil)-glycero-phosphatidsäure, n-Tetradecyl-glycero-phosphoglycerol, n-Hexadecyl-glycero-phosphoglycerol, n-Octadecyl-glycero-phosphoglycerol, n-Hexadecylen-glycero-phosphoglycerol, n-Octadecylen-glycero-phosphoglycerol, n-Tetradecyl-glycero-phosphoserin, n-Hexadecyl-glycero-phosphoserin, n-Octadecyl-glycero-phosphoserin, n-Hexadecylen-glycero-phosphoserin und n-Octadecylen-glycero-phosphoserin.  
 40

Die Gesamtkonzentration der Trägersubstanz beträgt zweckmäßig 0,1 bis 30 Gew.-%. Vorzugsweise beträgt diese Konzentration zwischen 0,1 und 15%, besonders häufig zwischen 5 und 10%.

Die Gesamtmenge des randaktiven Stoffes im System beträgt zweckmäßig 0,1% bis 99 Mol-% der Menge, die für eine Solubilisierung der Träger erforderlich wäre. Häufig liegt das Optimum wirkstoffabhängig in einem Bereich zwischen 1 und 80 Mol.-%, bevorzugt zwischen 10 und 60 Mol.-%; besonders bevorzugt werden Werte  
 45  
 zwischen 20 und 50 Mol.-%.

Die Wirkstoffkonzentration liegt für Insulin zumeist bei 1 bis 500 I.U./ml; vorzugsweise liegt die Konzentration darunter zwischen 20 und 100 I.U./ml. Die Trägerkonzentration liegt dann vorzugsweise im Bereich von 0,1 – 20 Gew.-%, häufig zwischen 0,5 und 15 Gew.-%, besonders häufig zwischen 2,5 und 10 Gew.-%.

Für die Herstellung werden die Trägersubstanzen, insbesondere Lipide, entweder als solche oder gelöst in einem physiologisch verträglichen, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsvermittler mit einer polaren Lösung kombiniert und so die Trägerbildung eingeleitet.  
 50

Vorteilhaft ist, daß die polare Lösung die randaktiven Substanzen enthält. Diese können auch in den Lipiden bzw. deren Lösung enthalten sein.

Die Trägerbildung wird bevorzugt durch Einrühren, mittels Verdampfung aus einer Umkehrphase, durch ein Injektions- oder Dialyseverfahren, durch mechanische Einwirkung, z. B. durch Schütteln, Rühren, Homogenisieren, Ultraschall, Reiben, Frieren bzw. Auftauen, durch Hoch- und Niederdruck-Filtration oder sonstige Energiezufuhr herbeigeführt.  
 55

Es kann vorteilhaft sein, wenn der Wirkstoffeinschluß nach der Trägerbildung erfolgt.

Bei der Herstellung der Transfersomen durch Filtration wird bevorzugt, daß das Filtermaterial eine Porengröße von 0,1 – 0,8 Mikrometer, insbesondere 0,15 – 0,3, und besonders bevorzugt 0,22 Mikrometer hat, wobei auch mehrere Filter hintereinander verwendet werden können.  
 60

Im Falle einer Transfersomenherstellung mittels Ultraschall werden vorzugsweise Energiedichten von 10 – 50 kW/Liter/Minute verwendet; in mechanischen Rührwerken sind z. B. typischerweise Umdrehungsbereiche von 1000 bis 5000 pro Minute für die Herstellung von Transfersomen gut geeignet: in Hochdruckhomogenisatoren gewährleisten Drücke von 300 – 900 bar nach einer Passage ausreichende Transfersomenhomogenität und -qualität, wobei auch Suspensionen mit 20 – 30% Lipid problemlos bearbeitet werden können.  
 65

Es ist oft zweckmäßig, die Transfersomen kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder Lyophilisat

herzustellen.

Kryopreservantien, wie z. B. Oligosaccharide, erleichtern dabei die Transfersomenbildung aus dem Lyophilisat.

Übliche Wirk-, Hilfs- oder Zusatzstoffe, vorzugsweise Stabilisatoren, Konservierungsmittel, Konsistenzbildner, oder Marker können im Erfindungszusammenhang verwendet werden.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, ohne sie zu beschränken. Temperaturen sind in Grad Celsius, Trägergrößen in Nanometer, und sonstige Größen in üblichen SI Einheiten angegeben.

#### Beispiel 1

##### Zusammensetzung

386 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen (reiner als 95%)  
 58,5 mg Natrium-Cholat (L/D = 3,5)  
 500 µl Ethanol (96%)  
 2,25 ml 0,9% NaCl-Lösung (pro Injektione)  
 2,25 ml Actrapid HM 40 (entspricht 90 I.U. rekombinantes Humaninsulin)

##### Herstellung

Das Lipid wird im erwärmten Ethanol gelöst, dann wird das Na-Cholat in dieser Lösung aufgelöst.

Zu der alkoholischen Lösung wird ein Gemisch der wäßrigen Kochsalzlösung mit dem humanen, rekombinanten Insulin (mit 6,75 mg m-Cresol) hinzugefügt. Es entsteht eine trübe Suspension, die über Nacht gealtert wird. Nach 12 Stunden wird diese Suspension mittels Stickstoffgas mit einem Druck von 0,25 MPa unter sterilen Bedingungen durch ein Sterilfilter (Anodisc, Porendurchmesser 0,2 µm) gepreßt und anschließend abgepackt.

Das nominale Lipid/Cholatverhältnis beträgt 3,5/1, die berechnete molare Cholatkonzentration in der Lipiddoppelschicht entspricht einem Verhältnis von 3/1. Das entspricht schätzungsweise 50% der Solubilisierungskonzentration.

Der mittlere Vesikelradius der fertigen Suspension in dieser Präparation, bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung, beträgt 97 nm.

##### Anwendung

400 µl der frischen, insulinhaltigen Transfersomen-Vesikel-Suspension werden auf die unvorbehandelte Haut am linken Unterarm einer informierten, freiwilligen, gesunden, männlichen, seit 18 Stunden nüchternen Testperson (37 Jahre) aufgetragen und über ca. 10 cm<sup>2</sup> verteilt. 5 Minuten später werden weitere 200 µl derselben Suspension zu jeweils einer Hälfte auf den Unter- und Oberarm plaziert. Das entspricht insgesamt 12 I.U. Insulin. 5 – 10 Minuten später ist die Suspension am Oberarm (Dosis ca. 2,5 mg/cm<sup>2</sup>) nicht mehr sichtbar, also vollkommen eingedrungen, während am Unterarm (Dosis ca. 7,5 mg/cm<sup>2</sup>) noch Lipidreste zu beobachten sind.

##### Wirkung

Um die Insulinwirkung zu erfassen, wird am rechten Handgelenk ca. 2 Stunden vor dem Probenauftrag ein i.v. Katheter positioniert. In Zeitabständen von 15 – 45 Minuten werden jeweils 1 – 1,5 ml Blut gezapft; die jeweils ersten 0,5 – 1 ml werden verworfen und die restlichen 0,5 ml für einen enzymatischen Glucosetest verwendet. Es werden jeweils drei Messungen von vier unabhängigen Proben durchgeführt. Die Messergebnisse sind in der Abb. 1 wiedergegeben. Sie zeigen, daß mittels Transfersomen-Vesikeln ca. 90 Minuten nach dem Auftrag eine signifikante Blutglucosesenkung eintritt, die ungefähr 2 Stunden dauert und ca. 50% der Höhe und 200% der Dauer einer vergleichbaren subkutanen Insulinapplikation hat.

#### Beispiel 2

##### Zusammensetzung

120 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen (reiner als 95%)  
 20 mg Natrium-Cholat p.a. (L/D = 3,2)  
 150 µl Ethanol (96%)  
 1,45 ml Actrapid HM 100 (rekombinantes Humaninsulin 100 I.U./ml)

##### Herstellung

Die Herstellung erfolgt mit kleinen Abwandlungen wie im Beispiel 1 beschrieben. Der Unterschied besteht darin, daß das Lipid/Insulingemisch bereits einige Minuten nach der Zubereitung mittels einer 1 ml Einmalspritze durch einen 0,22 µm Polycarbonatfilter (Sartorius) handfiltriert wird. Das Endvolumen der Suspension beträgt 1,2 ml; das Lipid/Cholatverhältnis ist nominal 2,8/1, in der Membran ca. 2,4/1. Die Endkonzentration von Insulin entspricht 83 I.U./ml; der Vesikelradius beträgt einen Tag nach der Herstellung im Durchschnitt 94 nm; eine Woche danach 170 nm.

## Anwendung

Anderthalb Stunden nach Versuchsbeginn werden 240 µl der frischen, sterilen Suspension von insulinhaltigen Transfersomen entnommen (20 I. U.). Diese werden auf die Innenfläche des rechten Unterarms eines männlichen, seit 18 Stunden nüchternen Probanden aufgetragen und zu ca. 0,7 mg/cm<sup>2</sup> gleichmäßig verteilt. 5 Minuten später ist die Haut makroskopisch trocken; 45 Minuten später ist keine Spur des Auftrages mehr zu sehen.

## Wirkung

Durch einen i.v. Katheter im linken Unterarm werden in ungleichmäßigen Zeitabständen alle 15 bis 40 Minuten Blutproben entnommen. Die Blutglukosebestimmung erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben.

Der zeitliche Ablauf der transfersombedingten Hypoglykemie ist in der Abb. 2 dargestellt. Der Blutglukosespiegel sinkt nach anderthalb Stunden um 10 mg/ml ab; diese künstliche Hypoglykemie dauert mindestens 4 Stunden an und erreicht somit 70–80% des Wertes, der mittels herkömmlicher subkutaner Insulinapplikation mit dem Arzneimittel Actrapid erreicht wird. Die Kontrollergebnisse, bei einer solcher s.c. Insulinapplikation (von Transfersomen) erzielt, sind in diesem Bild als Kreuze dargestellt; die Gesamtwirkung entspricht dabei der für die freie Substanz erwarteten.

## Beispiel 3

## Zusammensetzung

216 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen (487 µl einer 50% Lösung in absolutem Äthanol)  
 27 mg Phosphatidylglycerol aus Ei (98%)  
 29,45 mg Ölsäure, puriss.  
 3 ml Actrapid HM 100 (rekombinantes Humaninsulin 100 I.U./ml)  
 40 µl 1 N NaOH  
 20 µl 1 N NaCl

## Herstellung

Die Lipide werden gemischt, bis die Lösung klar erscheint. Nach der Zugabe von Actrapid-Lösung, Lauge und Salzlösung entsteht eine trübe Suspension. Nach dem Durchpressen dieser Suspension durch ein Polycarbonatfilter mit Porendurchmesser von 0,2µm entsteht eine nur wenig opaleszente Suspension. Diese besteht aus Vesikeln(Transfersomen) mit einem mittleren Durchmesser von 320 nm.

## Anwendung

Die Ausgangskonzentration von Glukose im Blut eines Probanden (70 kg, 37 Jahre, normoglykemisch, 24 Stunden nüchtern) wird über 90 Minuten als Referenz gemessen. Anschließend wird die oben beschriebene Transfersomen-Suspension mit nominal 85 I.U. Insulin/ml, die 12 Stunden bei 4°C gelagert wurde, auf den rechten Unterarm aufgetragen (ca. 330 µl auf 15 cm<sup>2</sup>); das entspricht einem Auftrag von 28 I.U.

## Wirkung

Die Blutproben werden über einen heparinisierten Dauerkatheter aus einer Vene am linken Unterarm entnommen; 0,5 ml von jeder Probe werden sedimentiert und sofort eingefroren; mit dem restlichen Volumen wird die Glucosekonzentration enzymatisch bestimmt. Diese Konzentration fällt nach ca. 2,5 Stunden um ungefähr 8 mg/dl ab und bleibt über 4,4 Stunden herabgesetzt. Das entspricht 75% des maximal erreichbaren, im Kontrollversuch durch eine s.c. Injektion verursachten Effekts. Die Pharmakokinetik dieser Versuchsreihe ist in der Abb. 3 präsentiert.

In Abb. 4 sind die Resultate von drei beispielegemäßen perkutanen Insulinapplikationen mit Transfersomen und von zwei s.c. Injektionen zusammengefaßt.

## Beispiel 4

## Zusammensetzung

143 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen  
 18 mg Phosphatidylglycerol aus Ei (98%)  
 19,6 mg Ölsäure, puriss.  
 2 ml Actrapid HM 100 (200 I.U.)  
 25 µl 1 N NaOH

## Herstellung

Die Lipide werden in ein Glasgefäß eingewogen und mit der handelsüblichen Insulinlösung versetzt. Die entstandene trübe Suspension wird direkt mit einer Titanspitze ultrabeschallt (ca. 5 W, 3 × 5 Sekunden bei 22°C

mit jeweils 60 Sekunden Zeitabstand). Die resultierende, optisch klare Suspension enthält Vesikel mit einem mittleren Radius von  $114 \pm 17$  nm.

#### Anwendung und Wirkung

Die Ergebnisse sind innerhalb der Meßgenauigkeit identisch mit den im Beispiel 3 angeführten.

#### Beispiel 5

#### Zusammensetzung

143 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen  
18 mg Phosphatidylglycerol aus Ei (98%)  
20,5 mg Natrium-Oleat  
2 ml Actrapid HM 100 (200 I.U.)

#### Herstellung

Die Lipide werden in einem Glasgefäß in 0,15 ml abs. Ethanol aufgelöst und mit der handelsüblichen Insulinlösung versetzt. Ansonsten wird wie in Beispiel 4 verfahren.

#### Anwendung und Wirkung

Auf der Probanden-Unterarmhaut wird auf einer Fläche von ca.  $5 \text{ cm}^2$  ein feines Kunststoffgewebe befestigt. Dieses wird anschließend mit  $350 \mu\text{l}$  der insulinhaltigen Transfersomensuspension beschichtet und offen gelassen.

Die Senkung des Blutglucosespiegels beträgt nach 4 Stunden  $7,8 \text{ mg/dl}$  und nach 6 Stunden  $8,5 \text{ mg/dl}$ . Sie ist somit vergleichbar der im Beispiel 3 erzielten.

#### Beispiel 6

Es wird zunächst wie im Beispiel 3 verfahren, wobei jedoch die Zugabe von Kochsalzlösung ausgelassen wird; die trübe, unvorbehandelte Liposomensuspension wird zweigeteilt. 50% des Gesamtvolumens werden sterilfiltriert; der Rest wird 15 Sekunden lang bei Raumtemperatur mit 5 W beschallt. Der mittlere Vesikeldurchmesser in beiden Hälften ist ähnlich,  $300 \text{ nm}$  bzw.  $240 \text{ nm}$ .

#### Beispiel 7

Es wird wie in Beispielen 3 und 5 verfahren. Liposomen werden jedoch einmal, zweimal, oder dreimal nacheinander filtriert. Die mittleren Durchmesser betragen  $300$ ,  $240$ , und  $200 \text{ nm}$ .

Die Transfersomen gemäß Beispielen 6 und 7 lassen sich mit vergleichbarem Ergebnis gemäß Beispiel 3 anwenden.

#### Beispiel 8

#### Zusammensetzung

144,9; 152 mg Phosphatidylcholin aus Sojabohnen  
24,8; 17,6 mg Desoxycholat, Na-Salz  
1,45; 1,55 ml Actrapid HM 100 (145 I. U.)  
0,16 ml Ethanol, absolut

#### Herstellung

Die Lipide werden in Glasgefäße eingewogen, in Ethanol gelöst und mit der Insulinlösung versetzt. Die entstandene trübe Suspension wird über Nacht gealtert und anschließend nach 12 Stunden durch einen  $0,22 \mu\text{m}$  Mikrometer Filter gepreßt. Die nominale Insulin-Konzentration beträgt  $83$  bzw.  $84 \text{ I.U.}$ . Der mittlere Vesikelradius ist in beiden Fällen  $112 \text{ nm}$ .

#### Anwendung und Wirkung

Die allgemeinen Versuchsbedingungen sind wie in den Beispielen 1 – 4. Die Liposomensuspensionen ( $0,36 \text{ ml}$ , entspricht  $30 \text{ I.U.}$ ) werden auf jeweils eine Arminnenseite aufgetragen; die Blutproben werden aus dem anderen Arm durch eine Dauerkanüle entnommen.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 5 dargestellt. Sie zeigen, daß die Präparation mit einem vergleichsweise hohen Tensidgehalt (Probe 1,  $L/T = 3/1$ ) lediglich eine kaum signifikante Senkung im Blutglucosespiegel bewirken kann; die beinahe optimalen Transfersomen dagegen, mit einem um 30% geringeren relativen Tensidgehalt von  $L/T = 4,5/1$ , erzeugen eine sehr ausgeprägte "Hypoglykemie", die über viele Stunden Bestand hat.

Das ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Transfersomen den Wirkstoff nach einem ganz anderen, neuen Wirkprinzip durch die Haut tragen als klassische Formulierungen.

Dieses Beispiel zeigt weiterhin, daß im hier untersuchten System zwar auch solche Tensidgehalte verwendbar sind, die vom Optimum entfernt liegen, daß aber besonders vorteilhafte Ergebnisse erzielt werden, wenn der Tensidgehalt bestimmt und gewählt wird, der eine maximale Elastizität und damit Permeationsfähigkeit der Transfersomen bei gleichzeitiger (noch) ausreichender Stabilität gegenüber Auflösung, Platzen, Wirkstoffverlust usw. ergibt.

Im größeren Detail finden sich ergänzende Angaben zur Auffindung dieses Optimums bei verschiedenen Trägersystemen in der mit gleichem Anmeldetag vom selben Anmelder eingereichten, bereits erwähnten deutschen Patentanmeldung mit dem Titel "Präparat zur Wirkstoffapplikation in Kleinsttröpfchenform".

#### Patentansprüche

1. Präparat zur nichtinvasiven Verabreichung von antidiabetischen Wirkstoffen, besonders von Insulin, in Form liposomenartiger, den Wirkstoff enthaltender Tröpfchen von in einer membranartigen Hülle aus amphiphiler Substanz eingeschlossener, hydrophiler Flüssigkeit, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Präparat einen Gehalt einer randaktiven Substanz aufweist. 15
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt an randaktiver Substanz zwischen 0,1 und 99 Mol.-%, insbesondere zwischen 1 und 80 Mol.-%, bevorzugt zwischen 10 und 60 Mol.-% und besonders bevorzugt zwischen 20 und 50 Mol.-% des Gehaltes an randaktiver Substanz beträgt, bei dem der Solubilisierungspunkt der Tröpfchen erreicht wird. 20
3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Randspannung der Tröpfchen bis zu etwa 10 Piconewton beträgt.
4. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein physiologisch verträgliches polares oder nichtpolares Lipid ist, wobei die Membranstruktur vorzugsweise eine Doppelschicht ist. 25
5. Präparat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein Lipid oder Lipoid biologischer Herkunft oder ein entsprechendes synthetisches Lipid ist, bzw. eine Abwandlung solcher Lipide, insbesondere ein Glycerid, Glycerophospholipid, Isoprenoidlipid, Sphingolipid, Steroid, Sterin oder Sterol, ein schwefel- oder kohlenhydrathaltiges Lipid, oder aber ein anderes Lipid, das stabile Doppelschichten bildet, vorzugsweise eine halbprotonierte fluide Fettsäure. 30
6. Präparat nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, eine Phosphatidsäure, ein Phosphatidylserin, ein Sphingomyelin oder Sphingophospholipid, Glykosphingolipid (z. B. Cerebrosid, Ceramidpolyhexosid, Sulfatid, Sphingoplasmalogen), Gangliosid oder anderes Glycolipid umfaßt. 35
7. Präparat nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz ein synthetisches Lipid, vorzugsweise ein Dioleoyl-, Dilinoleyl-, Dilinolenyl-, Dilinolenoyl-, Diarachidoyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, Distearoyl-, phospholipid oder entsprechendes Sphingosinderivat, Glykolipid oder anderes Diacyl- bzw. Dialkyl-Lipid umfaßt. 40
8. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es mehrere randaktive Substanzen umfaßt.
9. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die randaktive Substanz ein nichtionisches, ein zwitterionisches, ein anionisches oder ein kationisches Tensid umfaßt, insbesondere eine langkettige Fettsäure oder einen langkettigen Fettalkohol, ein Alkyl-trimethyl-ammonium-Salz, Alkylsulfat-Salz, Cholat-, Deoxycholat-, Glycodeoxycholat-, Taurodeoxycholat-Salz, Dodecyldimethyl-aminoxid, Decanoyl- oder Dodecanoyl-N-methylglucamid (MEGA 10, MEGA 12), N-Dodecyl-N,N-dimethylglycin, 3-(Hexadecyldimethylammonio)-propansulfonat, N-Hexadecyl-sulfobetain, Nonaethylen-glykoloctylphenylether, Nonaethylen-dodecylether, Octaethylenglykol-isotridecylether, Octaethylen-dodecylether, Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20), Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monooleat (Tween 80), Polyhydroxyethylen-Cetylstearylether (Cetomacrogol, Cremophor O, Eumulgin, C 1000) Polyhydroxyethylen-4-Laurylether (Brij 30), Polyhydroxyethylen-23-Laurylether (Brij 35), Polyhydroxyethylen-8-Stearat (Myrj 45, Cremophor AP), Polyhydroxyethylen-40-Stearat (Myrj 52), Polyhydroxyethylen-100-Stearat (Myrj 59), polyethoxyliertes Rizinuöl 40 (Cremophor EL), polyethoxyliertes hydriertes Rizinuöl, Sorbitan-Monolaurat (Arlacel 20, Span 20), besonders bevorzugt Decanoyl- oder Dodecanoyl-N-methylglucamid, Lauryl- oder Oleoylsulfat-Salze, Natriumdeoxycholat, Natriumglycodeoxycholat, Natriumoleat, Natriumelaidat, Natriumlinoleat, Natriumlaurat, Nonaethylen-dodecylether, Polyethylenglykol-20-Sorbitan-Monooleat (Tween 80), Polyhydroxyethylen-23-Laurylether (Brij 35), Polyhydroxyethylen-40-Stearat (Myrj 52) und/oder Sorbitan-Monolaurat (Arlacel 20, Span 20) und Lysophospholipide wie n-Octadecylen (= Oleoyl)-glycero-phosphatidsäure, -phosphorylglycerol, oder -phosphorylserin, n-Dilauryl-glycero-phosphatidsäure, -phosphorylglycerol, oder -phosphorylserin, n-Tetradecyl-glycero-phosphatidsäure, -phosphorylglycerol, oder 65

-phosphorylserin und entsprechende Palmitoeloyl-, Elaidoyl-, Vaccenyl-Lysophospholipide.

10. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtkonzentration an Trägersubstanz im Präparat 0,1 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,1 bis 15 Gew.-%, besonders bevorzugt 5 – 10 Gew.-% beträgt.

11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff 1 bis 500 I.U.Insulin/ml, vorzugsweise zwischen 20 und 100 I.U./ml enthält und die Konzentration der Trägersubstanz im Präparat im Bereich von 0,1 bis 20 Gew.-%, insbesondere zwischen 0,5 und 15 Gew.-%, besonders bevorzugt zwischen 2,5 und 10 Gew.-% beträgt.

12. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es als amphiphile Substanz Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylglykol und als randaktive Substanz eine Lysophosphatidsäure oder Lysophosphoglycerol, ein Deoxycholol-, Glycodeoxycholol- oder Cholatsalz, ein Laurat, Myristat, Oleat, Palmitoleat, bzw. entsprechendes Phosphat- oder Sulfat-Salz, und/oder ein Tween- oder Myrj-Tensid sowie als Wirkstoff rekombinantes Humaninsulin enthält.

13. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vesikelradius der Präparat-Tröpfchen zwischen etwa 50 und etwa 200 nm, vorzugsweise zwischen etwa 100 und etwa 180 nm liegt.

14. Verfahren zur Herstellung eines Präparates zur nichtinvasiven Verabreichung von antidiabetischen Wirkstoffen, bei dem man aus wenigstens einer amphiphilen Substanz, wenigstens einer hydrophilen Flüssigkeit und wenigstens einem antidiabetischen Wirkstoff liposomenartige Tröpfchen erzeugt, dadurch gekennzeichnet, daß man die Tröpfchen mit einem Gehalt einer randaktiven Substanz versieht.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man separat jeweils die randaktive Substanz mit der amphiphilen Substanz und die hydrophile Substanz mit dem Wirkstoff vermischt und ggf. zur Lösung bringt, die Gemische bzw. Lösungen dann zu einer Mischung zusammenführt und in dieser durch Zufuhr von insbesondere mechanischer Energie die Tröpfchenbildung bewirkt.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die amphiphile Substanz entweder als solche oder gelöst in einem physiologisch verträglichen, mit hydrophilen Flüssigkeiten, insbesondere Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsvermittler mit einer polaren Lösung zusammengegeben wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Lösung mindestens eine randaktive Substanz enthält.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Tröpfchenbildung durch Einrühren, mittels Verdampfung aus einer Umkehrphase, durch ein Injektions- oder Dialyseverfahren, durch mechanische Beanspruchung wie Schütteln, Rühren, Homogenisieren, Ultraschall, Reiben, Frieren bzw. Auftauen oder Hoch- oder Niederdruck-Filtration herbeigeführt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Tröpfchenbildung durch Filtration bewirkt wird und das Filtermaterial eine Porengröße von 0,1 bis 0,8 µm, insbesondere 0,15 bis 0,3 µm und besonders bevorzugt 0,22 µm aufweist, wobei ggf. mehrere Filter hintereinandergeschaltet verwendet werden.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoffeinschluß wenigstens teilweise nach der Tröpfchenbildung erfolgt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die liposomenartigen Tröpfchen kurz vor der Anwendung aus einem Konzentrat oder Lyophilisat zubereitet werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen



— Leerseite —

Abbildung 1

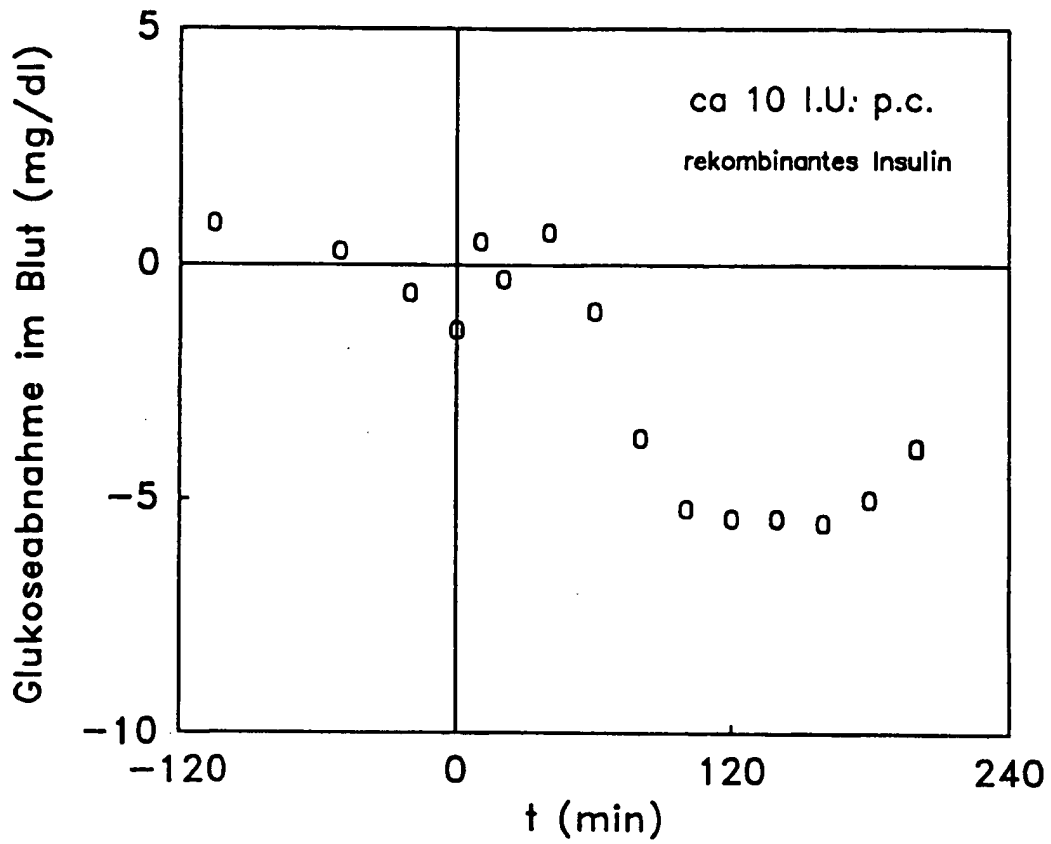


Abbildung 2

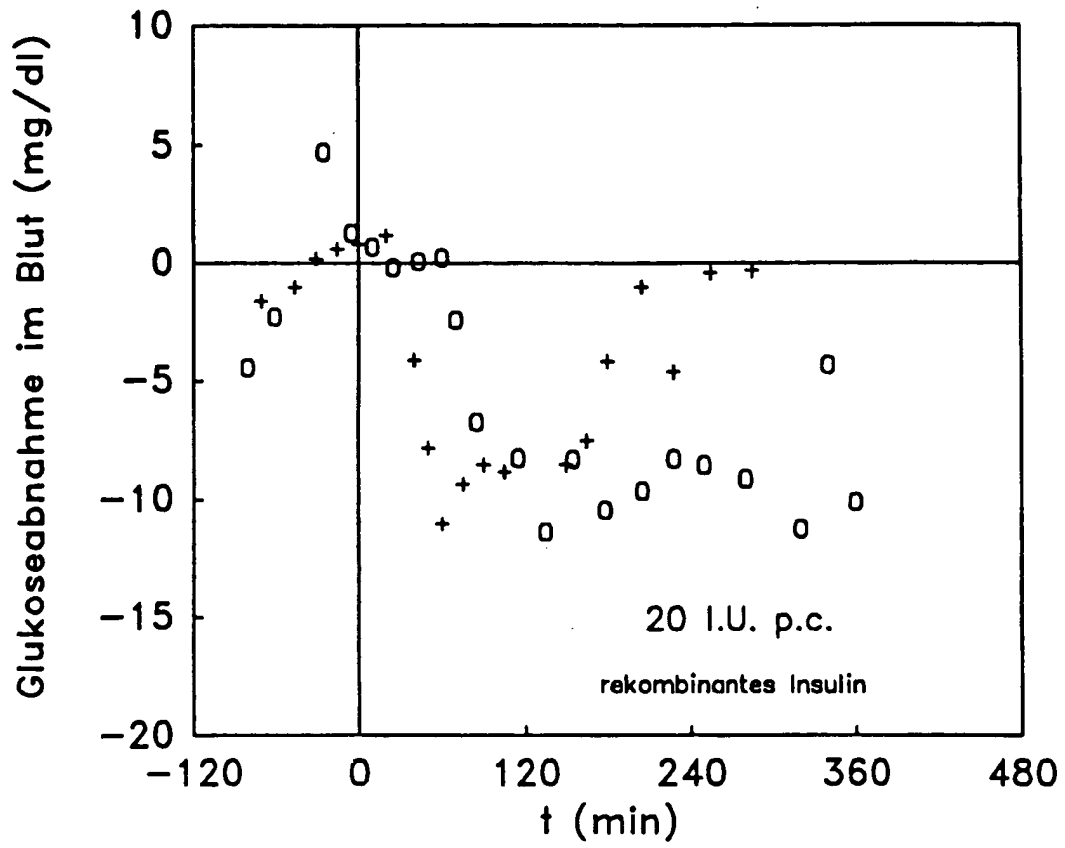


Abbildung 3

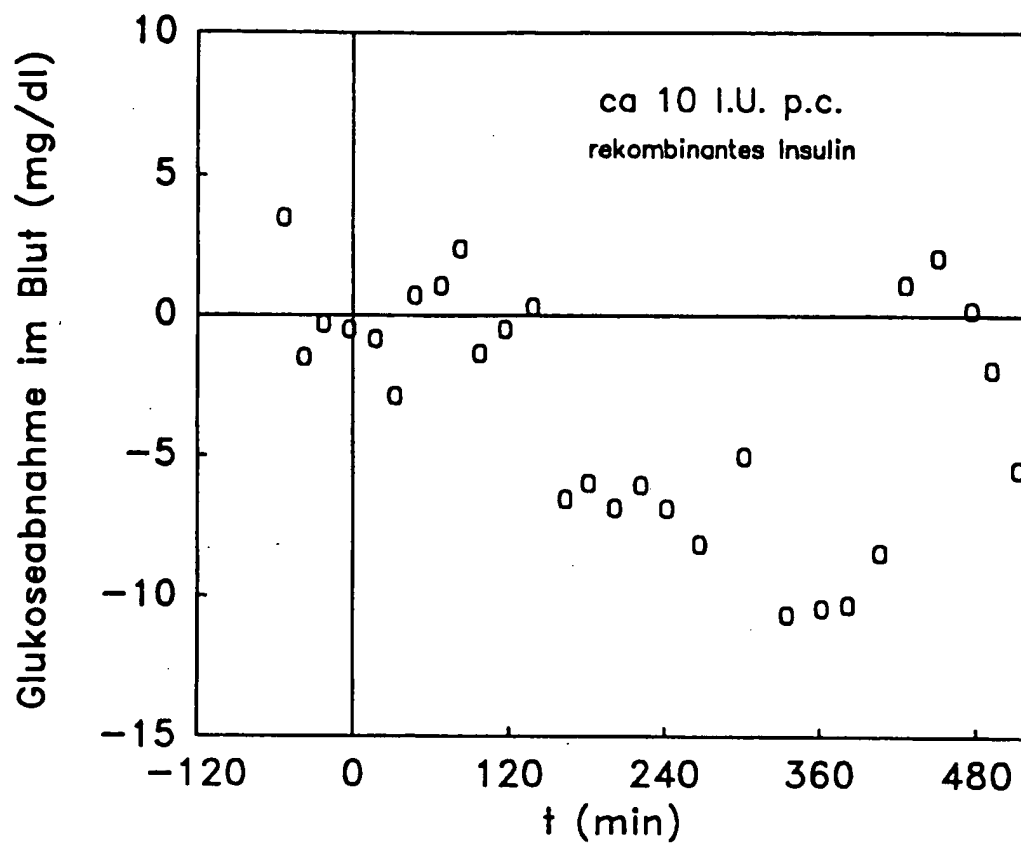


Abbildung 4

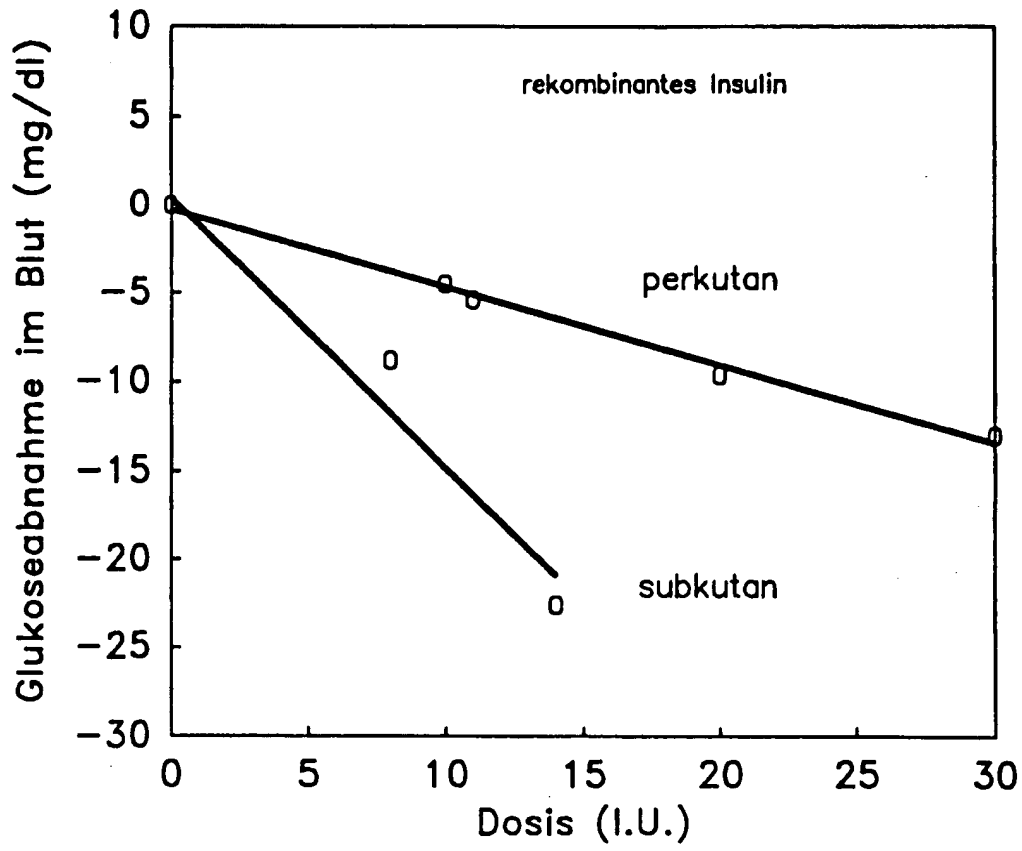


Abbildung 5

